

ANTIGEN AND MONOCLONAL ANTIBODY REACTIVE TO MEROZOITE OF EIMERIA SPP.**Publication number:** JP60072827**Publication date:** 1985-04-24**Inventor:** ROBAATO HARISU SHIENKERU; ROOJII
BITSUKUUHARU UON; PARAIA TAMANA**Applicant:** AMERICAN CYANAMID CO**Classification:****- international:** C12N15/02; A61K39/012; A61K39/395; C07K14/005;
C07K14/195; C07K14/44; C07K14/455; C07K16/00;
C07K16/20; C12N5/10; C12P21/08; G01N33/569;
G01N33/577; A61K39/00; C12R1/91; A61K39/002;
A61K39/395; C07K14/005; C07K14/195; C07K14/435;
C07K16/00; C07K16/18; C12N5/10; C12N15/02;
C12P21/08; G01N33/569; G01N33/577; A61K39/00;
(IPC1-7): A61K39/012; A61K39/395; C12N5/00;
C12N15/00; C12P21/00; C12R1/91**- European:** C07K14/455; C07K16/20**Application number:** JP19840170519 19840817**Priority number(s):** US19830524953 19830819**Also published as:**EP0135073 (A2)
JP5284993 (A)
FI843143 (A)
ES8900150 (A)
ES8802163 (A)

more >>

Report a data error he

Abstract not available for JP60072827

Abstract of corresponding document: **EP0135073**

Monoclonal antibodies against merozoites and sporozoites of *Eimeria tenella* are obtained by use of hybridoma technology. Specific antigens for use as vaccines in the prevention and treatment of coccidiosis and hybridoma cultures producing monoclonal antibodies are described.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-72827

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和60年(1985)4月24日
A 61 K 39/395 7043-4C
39/012 7043-4C
C 12 N 15/00 7115-4B
C 12 P 21/00 7235-4B ※審査請求 未請求 発明の数 5 (全12頁)

⑮ 発明の名称 エイメリア種のメロゾイトに対して反応性の抗原およびモノクロナル抗体

⑯ 特 願 昭59-170519

⑰ 出 願 昭59(1984)8月17日

優先権主張 ⑱ 1983年8月19日 ⑲ 米国(US) ⑳ 524953

㉑ 発 明 者 ロバート・ハリス・シ アメリカ合衆国ペンシルベニア州19067ヤードレイ・ロビンフッドドライブ355
エンゲル

㉒ 発 明 者 ローゼン・ビツク・ハ アメリカ合衆国ニュージャージー州08854ピスカタウェイ・ロスホールブルバード16
ル・ウオン

㉓ 出 願 人 アメリカン・サイアナ アメリカ合衆国ニュージャージー州ウエイン(番地なし)
ミド・カンパニー

㉔ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

エイメリア種のメロゾイトに対して反応性の抗原およびモノクロナル抗体

2. 特許請求の範囲

1. マウスの骨髓腫系統からの細胞およびエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)のメロゾイトで前もって免疫化したマウスからの脾細胞の融合により形成されたハイブリドーマにより生産され;

(a) エイメリア種(*Eimeria* spp.)のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と特異的に反応し;

(b) ほぼ15~350kdの範囲の分子量を有するエイメリア・テネラ(*Eimeria tenella*)の抗原と特異的に反応する;

モノクロナル抗体。

2. P3x63.Ag8.653骨髓腫細胞お

よびエイメリア・テネラ(*E. tenella*)のメロゾイトで前もって免疫化したマウスからの脾細胞の融合により形成されたハイブリドーマにより生産された特許請求の範囲第1項記載のモノクロナル抗体。

3. クローン番号1.90で表示されかつATCC No. HB8336として受託されたハイブリドーマにより生産され; クローン番号4.76で表示されたハイブリドーマにより生産され; クローン番号2.03で表示されかつATCC No. HB8389として受託されたハイブリドーマにより生産され; クローン番号13.90で表示されかつATCC No. HB8337として受託されたハイブリドーマにより生産され; クローン番号10.08で表示されたハイブリドーマにより生産され; クローン番号10.84で表示されかつATCC No. HB8387として受託されたハイブリドーマにより生産され; クローン番号8.03で表示されかつATCC

No. HB8388として受託されたハイブリドーマにより生産され；あるいはクローン番号15.84で表示されかつATCC No. HB8335として受託されたハイブリドーマにより生産された特許請求の範囲第2項記載のモノクロナル抗体。

4. 工程：

- (a) エイメリア・テネラ (E. tenella) のメロゾイトでマウスを免疫化し；
- (b) 前記マウスから脾臓を取り出し、そして脾細胞の懸濁液をつくり；
- (c) 前記脾細胞をマウスの骨髄細胞と融合促進剤の存在下に融合させ；
- (d) 融合した細胞を、融合しない骨髄細胞の生長を支持しない媒質中で別々のウェル中で希釈しかつ培養し；
- (e) ハイブリドーマを含有する各ウェルの上澄みを、エイメリア・テネラ (E.

- 3 -

8) または15.84 (ATCC No. HB8335) を適当な媒質中で培養し、そして前記ハイブリドーマの培養物の上澄みから抗体を回収することを特徴とするエイメリア種 (Eimeria spp.) のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と反応するモノクロナル抗体の生産方法；あるいはマウスにNo. 1.90 (ATCC No. HB8336)、4.78、2.03 (ATCC No. HB8389)、13.90 (ATCC No. 8337)、10.08、10.84 (ATCC No. HB8387)、8.03 (ATCC No. HB8388) または15.84 (ATCC No. HB8335) と表示されるハイブリドーマの培養物を注入し、そして前記抗原を前記マウスの腹水または血清から回収することを特徴とするエイメリア種 (Eimeria spp.) のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と反応するモノクロナル抗体の生産方法。

- 5 -

tenella) のメロゾイトおよびスポロゾイトと反応性の抗体の存在について評価し；

- (f) エイメリア・テネラ (E. tenella) のメロゾイトまたはスポロゾイトと反応性の抗体を生産するハイブリドーマを選択し、そしてそれをクローニングし；そして

- (g) 抗体を前記クローンから回収する；
- ことを特徴とする方法により生産された、エイメリア・テネラ (Eimeria tenella) のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と反応するモノクロナル抗体。

5. ハイブリドーマのクローンNo. 1.90 (ATCC No. HB8336)、4.78、2.03 (ATCC No. HB8389)、13.90 (ATCC No. 8337)、10.08、10.84 (ATCC No. HB8387)、8.03 (ATCC No. HB8388)

- 4 -

6. 特許請求の範囲第5項記載の方法の各々により生産されたモノクロナル抗体。

7. 洗剤剤含有緩衝液の存在下に可溶性であり、エイメリア・テネラ (Eimeria tenella) のメロゾイトの抗原として存在し、そしてほぼ 300 ± 50 k dの分子量を有するハイブリドーマのクローン1.90 (ATCC No. HB8336) および4.78により分泌された抗メロゾイトモノクロナル抗体と特異的に反応性であり；ほぼ 130 ± 20 k dの分子量を有するハイブリドーマのクローン10.84 (ATCC No. HB8337) および15.84 (ATCC No. HB8335) により分泌された抗メロゾイトモノクロナル抗体と特異的に反応性であり；あるいはほぼ 18 ± 3 k dの分子量を有するハイブリドーマのクローン10.08、8.03 (ATCC No. HB8388)、2.03 (ATCC No. HB8389) および13.90 (ATCC No. HB8337)

- 6 -

により分泌された抗メロゾイトモノクロナル抗体と特異的に反応性である、抗原性、免疫原性、タンパク質性実在物。

8. 安定剤および／または製薬学的に許容される補助剤をさらに含有する特許請求の範囲第7項記載のワクチン。

9. 工程：

(a) エイメリア・テネラ (*E. tenella*) のスポロゾイトおよび／またはメロゾイトを抽出し、そして可溶化し；

(b) クロマトグラフィーおよび親和性カラムの方法を包含するが、これらに限定されない単離および精製の方法により、可溶化された物質を分離して、精製された抗原を得る；

ことにより調製された特許請求の範囲第7項記載の抗原ワクチン。

10. 本発明のモノクロナル抗体により同定さ

- 7 -

の寄生虫により引き起こされる動物の病気である。鳥類のコクシジウム症は、エイメリア (*Eimeria*) 属の種々の種により引き起こされる食用飼鳥類の破壊的な病気である。この病気は、無性および有性の両者の段階から成る複雑な生活環を有する。ニワトリは、糞便に一般に関連する自由に生きる接合子嚢の摂取後に、この病気に初めに感染する。接合子嚢は、ニワトリの消化管中で発育して侵入的な無性のスポロゾイトになる。スポロゾイトは上皮細胞に侵入感染し、発育してシゾン (schizonts) として知られる多核の構造体になる。各シゾンは成熟し、究極的にメロゾイトとして知られる侵入的な無性の構造体を遊離する。これらのメロゾイトは、感染された細胞を残し、そして他の上皮細胞を再び侵す。スポロゾイトおよびメロゾイトを含む多数の侵入的な無性段階は、コクシジウム症の病理学の多くの原因となる。メロゾイトが配偶子母細胞に分化するとき、コクシジウム症の有性サイクルが

- 9 -

れた1種または2種以上の抗原に家畜種を暴露することを特徴とするエイメリア種 (*Eimeria spp.*) の感染を防除する方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、寄生虫エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) のメロゾイト (merozoites) およびスポロゾイト (sporozoites) に対して特異的に反応するモノクロナル (monoclonal) 抗体を得ることに関する。エイメリア・テネラ (*E. tenella*) に対する抗体を生産するハイブリドーマ (hybridoma) の培養物を記載する。メロゾイトの抗原を同定し、特性づける。これらの抗原は、ある種のモノクロナル抗体と一緒に、コクシジウム症 (coccidiosis) の予防および処置に有効である。本発明の抗原は、コクシジウム症に対するワクチンとして有用である。

背景として、コクシジウム症は種々の原動物

- 8 -

開始される。配偶子合体 (fertilization) が起こり、そして接合子嚢として知られる配偶子合体の生産物は糞便中に放出される。こうして、寄生虫の生活環が完結される。ニワトリにおいて、代表種のエイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) の生活環がは約7~9日で完結する。

エイメリア種 (*Eimeria spp.*) により家畜産業へ与えられる莫大な経済的損失のため、前記寄生虫に対するワクチンは高度に望ましい。寄生虫の生活環は複雑であり、かつ各段階に存在する抗原の量は変動するため、不活性化した寄生虫または殺した寄生虫は不変の免疫性を過去において発生しないことが観察されてきた。この問題の1つの解決法は、特定の抗原を寄生虫から単離し、特性づけ、そしてそれらを十分な量で投与して免疫化剤として作用させることである。好ましくは、このような抗原はすべての重要な種による感染に対する保護を提供するであろう。エイ

- 10 -

メリア (*Eimeria*) の種々の種、ならびに同一種の生活環の異なる段階、は共通の抗原および特別の抗原を有することが知られている [Cerna, Z., *Folia Parasitologica (Praque)* 17: 135-140 (1970); Davis *et al.*, *Immunol.* 34: 879-888 (1978); Rose, M. E., *Immunol.* 2: 112-122 (1959); Rose *et al.*, *Immunol.* 5: 79-92 (1962); および Taniellian *et al.*, *Acta Parasitol. Yugoosl.* 7: 79-84 (1976)]。また、エイメリア (*Eimeria*) への免疫性の発現は種特異的であり、そして家禽のある種において、有意の系統特異的免疫性が存在することが知られている [Jeffers, T. K.; In Long, P. L. *et al.* (eds.), *Avian Coccidiosis*, pp. 57-

- 11 -

泌するハイブリドーマ細胞を生産することが可能である [Köhler & Milstein, *Nature (London)* 258: 495-497 (1975)]。前記寄生虫に対するモノクロナル抗体が得られる場合、感染された家禽または感染しやすい家禽に対するこのような抗体を準備し、こうしてある程度 of 受動免疫をもつ宿主有機体を得ることが可能であろう。モノクロナル抗体を生産するこのようなハイブリドーマの培養物がいったん得られると、種々の手順により、このような抗体を利用して、特定の抗原を単離し、同定することが可能であり、前記抗原をワクチンとして利用して能動免疫の系をもつ宿主有機体を提供することができるであろう。ハイブリドーマの培養物およびモノクロナル抗体に関する種々の特許が知られている (すなわち、米国特許第 4, 172, 124 号; 同第 4, 198, 285 号; 同第 4, 271, 145 号; 同第 4, 361, 549 号; 同第 4, 831, 550 号; 同第 4, 3

- 13 -

125, *Proc. 13th Poultry Sci. Symp.* (1978); Joyner, L. P., *Parasitol.* 59: 725-732 (1969); Long, P. L., *Parasitol.* 69: 337-347 (1974); および Long *et al.*, *Parasitol.* 79: 451-457 (1979)]。現在、鳥類または哺乳類の宿主において防御免疫を刺激することができるエイメリア (*Eimeria*) 種の免疫原はまだ単離あるいは同定されてきていない。このようなエイメリア (*Eimeria*) の免疫原は、コクシジウム症に対して有効な免疫化を提供するように思われる。

リンパ球のハイブリドーマ技術の開発は、エイメリア (*Eimeria*) の種々の抗原に対して特異的な抗体を比較的大量に生産する道具を提供する。特異的抗体生産性細胞 (脾細胞) を骨髓腫の細胞と融合することにより、もとの感作抗原に対して特異的に向けられたモノクロナル抗体を分

- 12 -

64, 932 号; 同第 4, 384, 933 号; 同第 4, 364, 934 号; 同第 4, 364, 935 号; 同第 4, 364, 936 号; 同第 4, 381, 292 号; および同第 4, 381, 295 号)。

動物の飼育の領域、より詳しくは食用飼鳥類の産業におけるコクシジウム症の経済的効果の前述の考察に照して、原生動物の寄生虫の抑制は高度に望ましい。したがって、本発明の目的は、寄生虫のエイメリア・テネラ (*E. tenella*) のメロゾイトに対して得られた新規なかつ有用なモノクロナル抗体を提供することである。他の目的は、家禽のコクシジウム症を抑制するためのワクチンとして有用なエイメリア・テネラ (*E. tenella*) の特定の抗原を単離し、かつ同定することである。これらの目的は以下の説明から明らかとなり、とくに特許請求の範囲に記述されている。

エイメリア・テネラ (*Eimeria ten*

- 14 -

ella) は、ニワトリの盲腸に感染する種であり、感染した動物における血液の重い病変を起こす、とくに破壊的な寄生虫である。エイメリア・テネラ (E. tenella) はその生活環において2つのメロゾイト段階を有し、それらの段階はそれぞれ第1世代および第2世代のメロゾイトと表示される。エイメリア・テネラ (E. tenella) に対する免疫は、その生活環の無性のメロゾイト段階の間に発現することが知られている (Long, P. (ed.), The Biology of the Coccidia, University Park Press, Baltimore, Md. (1982))。

エイメリア・テネラ (E. tenella) のメロゾイトの調製物は、後述の手順に従い、マウスを免疫化して、究極的にモノクロナル抗体を発生させるために使用される。これらのモノクロナル抗体を使用して前記寄生虫の抗原を同定す

- 15 -

ベトリ皿 (plate) (Dynatech) 上へ $1400 \times g$ において10分間遠心して、有機体をウェルの底へ結合させた。ベトリ皿の底へ付着するスポロゾイトまたはメロゾイトを、ハイブリドーマの培養上澄み中で寄生虫またはモノクロナル抗体で免疫化したマウスの血清試料と反応させた。抗体とのインキュベーションを、4°C において16~18時間あるいは室温において2時間実施した。結合した抗体を放射線標識第2抗体 187.1 [これは κ 軽鎖 (light chain) に対して特異性のラットのモノクロナル抗体である] で検出した。抗マウス κ 軽鎖抗体を、 ^{125}I -S-メチオニンで生物学的に標識する [Yellison, D. E., et al., Hybridoma, 1: 5-11 (1982)]。放射能を液体シンチレーションの計数により監視する。引き続いて放射線免疫アッセイを、エイメリア・テネラ (E. tenella) のスポロゾイトから得られた表面膜へ適用して、免疫マウス血清

- 17 -

る。これらのモノクロナル抗体をさらに評価して、前記寄生虫の生体内の生長を中和するそれらの能力をアッセイする。エイメリア (Eimeria) の少なくとも1種の種と反応し、あるいはメロゾイトまたはスポロゾイトと反応するモノクロナル抗体を引き出し、そして前記寄生虫の生長の中和を示す抗原は、防御抗原と考えられる。防御抗原は、家禽類のコクシジウム症に対するワクチンの開発のための潜在的な候補と見なされる。

次の実施例により、本発明をさらに説明する。

実施例 1

定量的放射線免疫アッセイ

抗体の量を評価するために、定量的放射線免疫アッセイを開発した。グルタルアルデヒド固定スポロゾイトまたはメロゾイト [通常 $2 \sim 5 \times 10^5$ / ウェル (well)] を96のウェルのポリ塩化ビニルすなわち emovawell の

- 18 -

中の抗体と膜タンパク質との反応を確保する。

実施例 2

ハイブリドーマ培養物の構成

ニワトリの腎細胞の一次培養物を、この分野で知られた手順に従って、新しく産卵から出現した (excysted) スポロゾイトで感染させる。感染後5日に培地中に放出されたメロゾイトを、 $350 \times g$ において10分間遠心することにより収穫する。生まれてから18週の雌の BALB/c マウスを、完全フロインドアジュバント中の 1×10^7 の無傷または断片化エイメリア・テネラ (E. tenella) メロゾイトで腹腔内 (i.p.) 免疫化する。動物を、初期の免疫化後、2×5週の間隔で、培地 199 (Gibco) 中のメロゾイトを2回腹腔内注射することにより促進 (boost) する。各促進後3日に得られた血清を、直接免疫蛍光アッセイ (IFA) および放射線免疫アッセイ (RIA) により、エイメリア・テネラ (E. tenella) メロ

- 18 -

ゾイトに対する抗体の存在について検査する。これらのアッセイの両者は、グルタルアルデヒド固定寄生虫について実施する。

ハイブリドーマは、確立された方法に従い誘導する [Kwan et al., (1980), Genetic Engineering ed. by J. K. Setlow & A. Hollander, Plenum Publishing Corp., New York, pp. 31-96]。エイメリア・テネラ (E. tenella) メロゾイトで免疫化した2匹のマウスからの脾細胞を、30%のポリエチレングリコール (PEG 1000, Baker Chemical) の存在下に P3 骨髓腫、P3-X63, Ag8.653 の非分泌性 (non-secreting) クローンと8分間融合する。融合した細胞を96ウェルの組織培養皿 (Linbro) 中に分布させ、HAT選択培地 [Littlefield, J. W., Science, 145:

- 18 -

709-710 (1964)] 中で維持する。HAT培地は20%の胎児牛血清 (Gibco) および10%のNCTC 109 (Microbiological Associates) を含有するダルベコ (Dulbecco) の変更イーグル (Eagle) 培地中で調製する。ハイブリッド (hybrids) をインキュベーター内で37°Cおよび10%のCO₂において培養する。

培養物を、エイメリア・テネラ (E. tenella) メロゾイトと反応性の抗体について、IFAおよびRIA法により周期的にアッセイする。陽性の培養物を、24ウェルの組織培養皿のヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含まない培地中へ移す。ハイブリドーマをラット胚線維芽供給細胞層の上の軟質アガロース中でクローニングする [Coffins et al., J. Cell Physiol., 79: 429-440 (1972)]。陽性のハイブ

- 20 -

リドーマのクローンをサブクローン (subclone) 番号で表示する (すなわち、クローン15.84.4は15.84と表示するハイブリドーマのサブクローン#4である)。良好に特性づけられるサブクローンにより分泌される免疫グロブリンの綱および亜綱を、寒天二重拡散法により決定する。ハイブリドーマの洗浄剤 (NP-40) 可溶性の抽出液を、ウサギ抗マウス抗体試薬 (Mellory) と一緒に使用する。

実施例3

抗メロゾイトモノクロナル抗体の特性づけ

8種類の抗メロゾイトモノクロナル抗体の特性を表Iに示す。モノクロナル抗体の大部分は、IFAならびにRIAによると、メロゾイトならびにスポロゾイトと反応した。モノクロナル抗体1.90および4.78は、スポロゾイトとIFAにおいて反応せず、そしてRIAにおいて時には反応しなかった (表I中の本参照)。モノクロナル抗体15.84はIFAにおいてメロゾイト

- 21 -

と反応しなかったが、RIAにおいてスポロゾイトならびにメロゾイトと等しく良好に反応した。表Iに要約したデータが示すように、抗メロゾイト融合から誘導されたモノクロナル抗体のすべてはエイメリア・テネラ (E. tenella) のスポロゾイトならびにメロゾイトと交差反応する。

- 22 -

表 I

抗メロゾイトモノクロナル抗体の特性づけ

特異性

モノクロナル抗体	I F A		R I A	
	メロゾイト	スポロゾイト	メロゾイト	スポロゾイト
M 1 (1 . 9 0)	+	-	+	*
M 2 (4 . 7 6)	+	-	+	*
M 3 (2 . 0 3)	+	+	+	+
M 4 (1 3 . 9 0)	+	+	+	+
M 5 (1 0 . 0 8)	+	+	+	+
M 6 (1 0 . 8 4)	+	+	+	+
M 7 (8 . 0 3)	+	+	+	+
M 8 (1 5 . 8 4)	-	+	+	+

23

実施例 4

種々のスポロゾイトに対する抗メロゾイトモノクロナル抗体の反応性

商業的に重要な5種類の球虫綱(coccidia)の種から誘導されたスポロゾイトに対して I F A により、モノクロナル抗体をアッセイする。これらの実験からのデータを表 II に要約する。エイメリア・テネラ (*E. tenella*) から誘導されたスポロゾイトと I F A において反応した6種類のモノクロナル抗体を使用して、種の交差反応性を研究する。結果が示すように、5種類のモノクロナル抗体はエイメリア・ネカトリックス (*E. necatrix*) およびエイメリア・マクシマ (*E. maxima*) と反応し、そして1種類のモノクロナル抗体 (15.84) は試験したすべてのエイメリア (*Eimeria*) の5種と反応した。

表 II

種々の種のスポロゾイトに対する抗メロゾイトモノクロナルの反応性

モノクロナル抗体	エイメリア・テ ネラ (<u>E. t</u> <u>e n e l l</u> <u>a</u>)	エイメリア・ネ カトリックス (<u>E. n e c</u> <u>a t r i x</u>)	エイメリア・ア セルブリナ (<u>E. a c e</u> <u>r v u l i n</u> <u>a</u>)	エイメリア・マ クシマ (<u>E.</u> <u>m a x i m</u> <u>a</u>)	エイメリア・ブ ルネッチ (<u>E.</u> <u>b r u n e t</u> <u>t i</u>)
M3 (2.03)	+	+	-	+	-
M4 (13.90)	+	+	-	+	-
M5 (10.08)	+	+	-	+	-
M6 (10.84)	+	+	-	+/-	-
M7 (8.03)	+	+	-	+	-
M8 (15.84)	+	+	+	+	+

25

に保護を与える。

実施例5

生体内中和のアッセイ

モノクロナル抗体をアッセイする生体内手順を利用して、モノクロナル抗体を評価する。エイメリア・テネラ (E. t e n e l l a) スポロゾイトと反応する3種類のモノクロナル抗体をこのアッセイにより評価する。3種類の異なるハイブリドーマから誘導された熱不活性化腹水症体液を用いて、新しく単離したスポロゾイトを無菌条件下でインキュベーションする。インキュベーション期間は室温において1時間である。次いで、スポロゾイトを生まれてから3週のニワトリの盲腸に外科的手順により導入する。インキュベーション後5日間、寄生虫の発育を起こさせる。この期間の終りにおいて、病変を記録して感染の程度を評価する。これらの実験の結果を、モノクロナル抗体により提供された保護率として表わし、そして表IIIに示す。これらのデータが示すように、各抗体はこの試験系のある条件下で少なくとも部分的

表Ⅲ

エイメリア・テネラ (*E. tenella*) スポロゾイトおよび
抗メロゾイトモノクロナルを使用する生体内中和アッセイ

		保護%		
処理	動物の数	なし	部分的	完全
Ⅰ、 軽い感染				
(2000 スポロゾイト/動物)				
対照	14		65	35
M6 (10.84)	13		15	85
M8 (15.84)	18	5	17	78
Ⅱ、 重い感染				
(10000 スポロゾイト/動物)				
対照	7	100		
M4 (13.90)	9	89		11
M6 (10.84)	8	75	25	
M8 (15.84)	9	33	44	23
Ⅲ、 重い感染				
(30000 スポロゾイト/動物)				
対照	7	100		
M6 (10.84)	7	86		14
M8 (15.84)	4	100		

実施例8

抗原の特性づけ

モノクロナル抗体により認識されるエイメリア・テネラ (*E. tenella*) を、SDS ポリアクリルアミドゲルの電気泳動 (PAGE) により、次いでニトロセルロースのブロットイング (blotting) 手順により同定する [Townblin et al., *Proced. Natl. Acad. Sci. (USA)* **76**: 4350-4354 (1979)]。

エイメリア・テネラ (*E. tenella*) のスポロゾイトおよびメロゾイトを、155 ミリモルの NH_4Cl 、1.5 ミリモルの MgAc_2 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテアーゼ阻害剤のルーベプチン (leupeptin) およびアンチペイン (antipain)、4 ミリモルのフッ化フェニルメチルスルホニルおよびアプロチニン (2 トリプシン阻害単位/ ml) を含有する 10 ミリモルのトリス緩衝液 (pH 7.5) 中の

-29-

1% Nonidet P-40 (Bethesda Research Laboratory) で溶解 (lyse) しかつ抽出する。この溶解手順は、0°C における 30 分のインキュベーションおよび引き続く 2,500 \times g の 30 分の遠心を含む。沈殿物を廃棄し、次いで、可溶化された物質をゲル電気泳動に使用する。2-メルカプトエタノールで還元した試料の SDS ポリアクリルアミドゲルの電気泳動を、7~15% のポリアクリルアミドの勾配ゲル上の不連続のトリスグリシン系中で実施する。

SDS PAGE 分離したタンパク質を、ニトロセルロースフィルター上に電気泳動的に 45 分間移す。次いで、ニトロセルロースフィルターを、腹水症の体液 (1~100 倍希釈) またはハイブリドーマからの使用済みの培養流体と 4°C において 16~18 時間反応させる。正常のウサギの血清を 10% の濃度ですべての抗体とのインキュベーションにおいてインキュベーションし

-30-

た。結合したモノクロナル抗体は、 ^{125}I 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (New England Nuclear) と反応させることによって検出する。第2抗体との反応は、通常室温において 3~5 時間である。結合しない第2抗体を洗浄により除去する。次いで、ニトロセルロースフィルターを、コダック (Kodak) X線フィルム XAR-5 または SB-5 で露光する。

別法として、ブロット (blot) を、BLISA 法により、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス IgG (Miles) およびクロロナフトール (Aldrich) および B_2O_2 (Baker) を基質として使用して展開する。タンパク質の抗原の分子量を分子量標準に関して決定する。

モノクロナル抗体 18.84 により認識された抗原を例示する。モノクロナル抗体 15.84 は、 $130 \pm 20 \text{ kd}$ の概算分子量の二重のもの (doublet) と反応する。しかしながら、

-31-

100 kd 程度のタンパク質の分子量の推定を、使用する分子量標準に依存して変動させて行った。 $130 \pm 20 \text{ kd}$ 種に加えて、15.84 も $300 \pm 50 \text{ kd}$ の見掛け分子量を有する帯 (band) と反応する。より大きい分子量の帯は約 15~20% の抗原を構成し、そして多分 $130 \pm 20 \text{ kd}$ 種の凝集物または重合体の形態である。タンパク質抗原と反応しないことが知られているモノクロナル抗体と用いる対照実験を使用して、抗メロゾイト抗体の特異性を証明する。さらに、他の対照が証明するように、モノクロナル抗体は寄生虫特異性であり、宿主特異性のタンパク質と反応しない。

種々の抗体により認識される抗原の分子量のデータを、表 IV に要約する。有意味の特徴は、エイメリア・テネラ (*E. tenella*) メロゾイトにおいて分子量 $\leq 20 \text{ kd}$ または $> 100 \text{ kd}$ の範囲の免疫原抗体の存在である。

-32-

表IV

分子量のデータの要約

抗メロゾイト	
モノクロナル抗体	抗原の概算分子量
M1 (1.90)	300±50kd
M2 (4.76)	
M6 (10.84)	130±20kd
M8 (15.84)	
M3 (2.03)	18±3kd
M4 (13.90)	
M5 (10.08)	
M7 (8.03)	

-33-

収集物に加えられた。番号1.90は番号HB8336を割当てられた。番号15.84は番号HB8335を割当てられた。番号13.90は番号HB8337を割当てられた。番号10.84は番号HB8387を割当てられた。番号8.03は番号HB8388を割当てられ、そして番号2.03は番号HB8389を割当てられた。これらの抗体の利用は、特許および商標の局長により37 C.F.R.1.14および35 U.S.C.122に従って権利を与えられること決定されたものによって、本願の係属中において可能であり、そしてHB8333、HB8336、HB8337、HB8387、HB8388、およびHB8389の公衆への入手可能性のすべての制限は本願へ特許が付与されたとき最終的に排除される。

番号1.90、HB8336、15.84、HB8335、および13.90、HB8337はすべてATCCに1983年8月10日に受託さ

-35-

モノクロナル抗体15.84は中和性抗体と考えられ、そして認識された抗原は防御抗原と考えられる。さらに、15.84はエイメリア・テネラ (*E. tenella*) のメロゾイトおよびスプロゾイトならびにエイメリア・マクシマ (*E. maxima*)、エイメリア・ネカトリックス (*E. necatrix*)、エイメリア・アセルブリナ (*E. acervulina*) およびエイメリア・ブルネッチ (*E. brunetti*) から単離されたスプロゾイトと交差反応する。

前述の新規な抗体、1.90、15.84、13.90、10.84、8.03および2.03は、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (ATCC) (the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, U.S.A. 20852) に受託され、そしてその永久的

-34-

れた。番号10.84、HB8387、8.03、HB8388、および2.03、HB8389はATCCに1983年10月20日に受託された。

特許出願人 アメリカン・サイアナミド・カンパニー

代理人 弁理士 小田島 平 吉



-36-

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

// C 12 N 5/00
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

7115-4B

⑦発明者 バライア・タマナ

アメリカ合衆国ニュージャージー州07730ハズレット・ビ
レッジグリーンウェイ8